

大家畜에 있어서 受精卵移植의 現況과 展望 (上)

鄭 吉 生 / 建国大学校 畜産大学



I. 緒 論

1. 定 義

体内(in vivo) 또는 体外(in vitro)에서 受精된 哺乳動物의 卵子 즉, 수정란을 同種內的 同品種 또는 異品種의 他個体에게 이식하여 수태시키는 것을 受精卵移植이라 한다.

2. 歷 史

哺乳動物에 있어서의 受精卵移植은 소, 말, 면양, 산양, 돼지 등과 같은 家畜으로부터 토끼, 흰쥐, 생쥐 및 hamster 등의 實驗動物에 이르기까지 널리 실시되고 있다.

哺乳動物의 受精卵移植에 최초로 성공한 사람은 Heape (1890)로서 그는 토끼의 수정란을 他個体에 이식하여 4 마리의 仔똥을 생산하는데 성공하였다. 그후부터 이 분야에 대한 관심도 높아지고, 연구자도 늘어나 1950년 이후에는 면양(Warwick 등, 1949; Lopyrin 등, 1950), 산양(Warwick 등, 1949), 돼지(Kvansmickii, 1951) 및 소(Willett 등, 1951) 등의 家畜에서 受精卵移植에 의한 仔畜이 태어나기에 이르렀다. 이러한 실험적 연구결과를 기초로 하여 受精卵移植을 家畜의 繁殖技術로 활용하기 위한 연구가 진행되었고, 최근에는 면양과 산양에서는 수정란이식에 의하여 70~80%의 受胎率을 얻기에 이르렀다. 소에 있어서의 受精卵移植 기술도 현저한 진전을 보아 최근에는 凍結保存된 受精卵으로부터 犢牛가 태어나기에 이르렀다. 뿐만 아니라 미국, 호주, 뉴질랜드 및 캐나다 등지에서는 受精卵移植技術을 大家畜의 생산분야에 도입하여 그것만을 전업으로 하는 기업이 다수 등장하였으며, 육류부족이라는 세계적 趨勢에 힘입어 受精卵移植 기술을 소의 雙胎誘起에 이용하려는 시도가 각국에서 계획되고 있다.

3. 理論的 背景

生后 2~3個月齡의 송아지는, 개체에 따라 차이는 있으나, 卵巢 1개당 1~10만개의 난자를 가지고 있다. 그러나 이처럼 많은 난자의 대

부분은 性成熟期前, 發精週期中의 發精休止期 및 妊娠期나 泌乳期中에 대부분 退行하게 되어, 生后 12-13세가 된 老齡牛의 卵巢는 불과 수천 개의 卵子를 함유하고 있음에 불과하다. 더욱 한마리의 牝牛가 생애를 통하여 분만할수 있는 송아지는 12-15頭를 넘어설수 없다는 사실을 勘案할때 한마리의 牝牛가 원천적으로 보유하고 있는 卵子生産能力의 99%는 송아지 생산과 직결되지 못한채 상실되고 있음을 알 수 있다. 이러한 생리적 제약이 牝畜의 측면에서도 가축 개량을 촉진하려는 시도를 저해하는 결정적 요인이 되고 있음은 周知하는 바이다.

오늘날까지 가축개량을 위한 諸般試圖는 人工授精을 주된 무기로 하여 雄畜을 중심으로 추진되어 온것이 사실이다. 그러나 인위적 조작에 의하여 牝畜이 保有하고 있는 잠재적 卵子生産能力을 현실적으로 활용할 수만 있다면 한마리의 우수한 牝畜으로부터 현재보다 훨씬 많은 仔畜을 생산할 수 있을 것이고 그만큼 가축개량도 촉진될 수 있을 것이다. 오늘날 受精卵移植技術이 다양하게 이용되고 있지만, 적어도 축산의 경우에는, 牝畜의 卵子生産에 관한 潛在能力을 최대한로 활용하여 우수한 母系의 遺傳形質을 이어받은 仔畜을 일시에 多數生産함으로써, 가축개량을 신속하게 촉진할 수 있다는 이론적 배경에 근거를 두고 이 기술이 도입되었다고 볼 수 있다.

本論에서는 대가축 특히 소를 중심으로 하여 受精卵移植技術의 현황과 그 전망을 살펴보고, 同技術의 국내정착의 가능성 여부에 대하여 검토하기로 한다.

II. 受精卵 移植技術의 現況

1. 技術의 概要

소에 있어서 수정란이식을 성공적으로 수행하기 위해서는 그림 I에서 보는 바와 같은 數個의 과정을 단계적으로 실시하지 않으면 안된다. 이들 과정은,

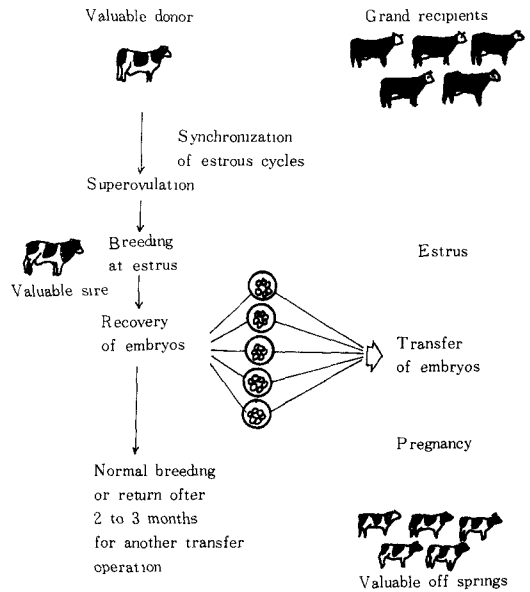


Fig 1. Procedures and significance of egg transfer

- (1) 移植에 필요한 多數의 卵子를 생산하기 위한 多排卵 誘起過程
 - (2) 排卵된 卵子를 체내 혹은 체외에서 수정시키는 過程.
 - (3) 수정된 난자를 체외로 回收하는 採卵過程.
 - (4) 採卵된 난자의 사용여부를 결정하는 檢卵過程
 - (5) 사용가능한 受精卵을 체외에서 보존하는 過程.
 - (6) 供卵牛와 受卵牛의 發精을 同期化 시키는 過程.
 - (7) 受精卵을 타 개체에 이식하는 過程
- 등으로 나누어 생각할 수 있다. 이하 이들 各過程에 관하여 좀더 구체적으로 살펴보기로 한다.

2. 多排卵誘起

자연조건하에서 한 발정기에 成熟하는 卵胞의 수는 牝牛의 경우 1-2개에 지나지 않는

다. 그러나 체외로부터 性腺刺戟호르몬을 투여하면 일시에 다수의 卵胞가 발육하며 그만큼 排卵되는 卵子數도 增加하게 된다.

몇가지 방법에 의하여 소에서 多排卵을 誘起할 수가 있다. 처음에는 그림 2에서 보는 바와

같은 방법이 채용되었다. 즉, 發精週期의 16일째에 3,000~4,000IU의 PMSG를 1回 皮下에 주사하고 그로부터 3일째와 4일째에 2~3mg의 estradiol을 각 1회씩 주사한다. 이어서 發情이 오면 배란을 촉진시키기 위하여 2,000IU

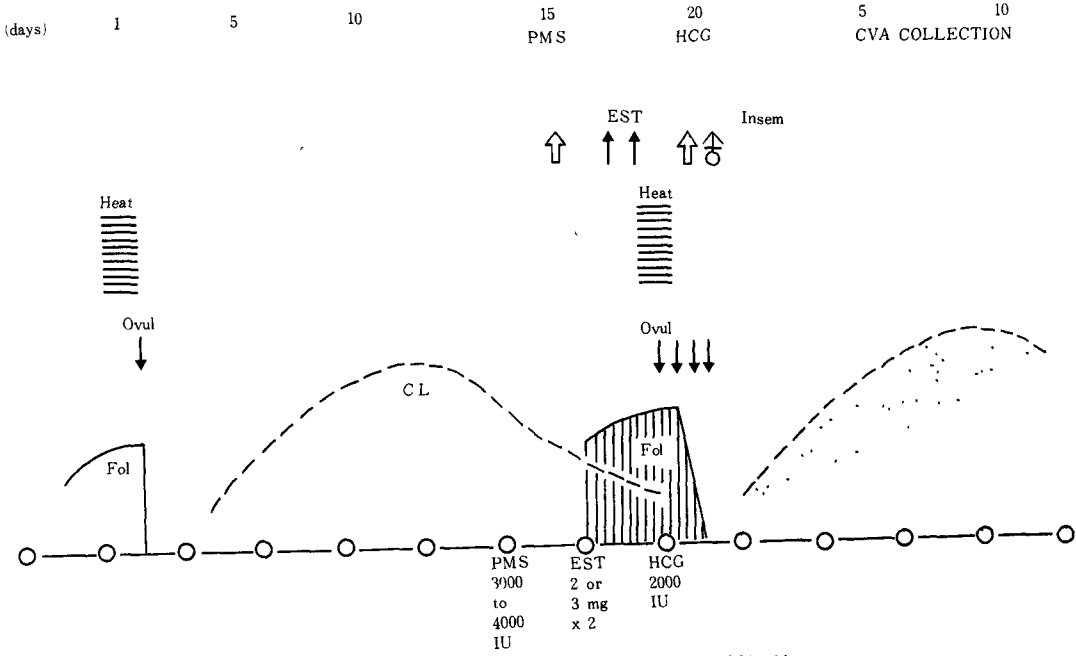
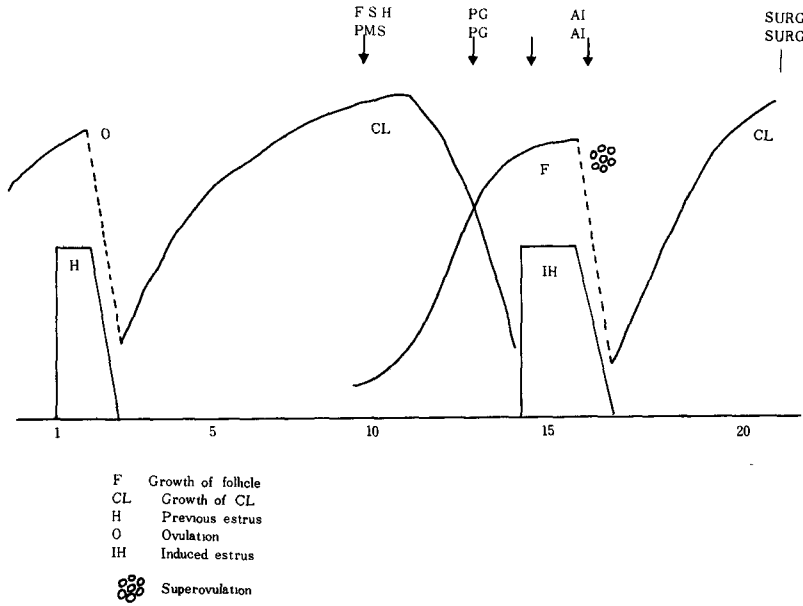


Fig 2. Hormonal treatments to induce superovulation in cattle(杉江等, 1972)



F Growth of follicle
 CL Growth of CL
 H Previous estrus
 O Ovulation
 IH Induced estrus
 Superovulation

Fig 3 Induction of superovulation with PMS and PGF_2X (金川 1976)

의 HCG를 정맥에 주사하고 바로 人工授精을 실시한다. 이 방법은 비교적 안정된 결과를 가져오므로 한때 日本等地에서 많이 채택된 적도 있으나. 發精週期の 15~16일째라는 제한된 시기에 해당하는 개체밖에는 供試할 수 없다는 약점이 있다. 이러한 약점을 補完하기 위하여 性腺刺戟호르몬과 黄体退行劑인 prostaglandin $F_2\alpha$ (以下PGF $_2\alpha$ 라略함)를 併用하는 방법이 개발되었다. 이 방법은 그림 3에 표시된 바와같이, 發精週期の 5~14日사이(排卵當日을 0日로 함), 즉 黄体期の 어느 시기를 택하여 2,000~3,000 IU의 PMSG를 筋注한 후, 그로부터 48시간째에 25~30mg의 PGF $_2\alpha$ 를 筋注한다. PGF $_2\alpha$ 投與後 대체로 48±12시간에 발정이 오므로 排卵을 촉진시키기 위하여 2,000IU의 HCG를 靜注한 다음 즉시 人工授精을 실시한다. 대체로 Standing estrus의 시기에 第1次授精을 실시하고 그로부터 12시간마다 2次와 3次的 人工授精을 실시하여 未受精卵의 發生을 줄인다. 단 최근에 와서는 HCG의 投與는 생략하는 경향이 있는데, 그것은 소의 경우 PMSG에 의하여 發育된 다수의 卵胞에서 분비되는 estradiol이 Feedback Mechanism에 의하여 排卵에 필요한 充分량의 LH를 分泌시킨다는 사실이 밝혀졌기 때문이다.

이 방법에 의하여 소나 산양의 경우, 대략 15~20개의 排卵이 誘起된다. 또 發精週期の 5~14日 사이에 있는 개체는 다같이 同時에 供試할 수도 있으므로 일시에 다수의 供試牛를 確保할 수 있다는 利點도 있다.

多排卵誘起에 있어서 가장 큰 難點은 同一한 방법을 채택해도 處理에 대한 反應이 個體에 따라 현저하게 다르다는 사실이다. 이러한 個體別 變異를 最少化하기 위하여 最近에는 性腺刺戟호르몬으로서 FSH와 LH를 併用하거나 또는 FSH만을 투여하여 좋은 成果를 올리고 있다. FSH를 單用하는 경우, 發精週期の 5~14日사이의 적당한 시기를 택하여 오전과 오후에 一定量의 FSH를 4~5日間 投與한다. 오전과 오후

Table 1 Procudece of supgrovulation by treatment with FSH and PGF $_2\alpha$

July 27	July 28	July 29	July 30	July 31	Aug 1	Aug 2	Aug 3	Aug 4
1	2	3	4	5	6	7	8	9
FSH FSH FSH FSH								
AM	AM	AM	AM	H	Br			
5	4	3	2mg	PGF $_2\alpha$				
PM	PM	PM	PM	Br	Ov			
5	4	3	2mg					

Table 2 Ovarian responses in cattle treated with PMSG at various times of the estrous cycle and with PG2 days later

Criterion of response and/or additional treatment	Day of cycle at time of PMSG treatment						Reference
	3 8		8 12		13 16		
	% animals	% responding	% animals	% responding	% animals	% responding	
8 or more ovulations	32	31.3	58	74.1			Phillippo and Rowson 1975
6 or more eggs recovered	32	34.4	58	60.3			
6 or more fertilized eggs recovered	32	6.3	58	34.5			ADRI 1977
3 or more ovulations	16	37.5 Av ovulation rate	58	77.6 Av ovulation rate	9	55.5 Av ovulation rate	

의 投與量은 같으나, 대체로 初日에는 5mg으로 부터 시작하여 毎日 減量하여 2~1mg으로 끝낸다. 최초의 FSH 投與後 48시간에 25~30mg의 PGF₂α를 投與하는 것은 前述한 경우와 같다. (표 1 참조) FSH와 同時에 LH를 併用하기로 한다. 이런 경우 FSH와 LH의 比率은 4:1이다.

黄体退行劑인 PGF₂α를 性腺刺戟호르몬과 併用하면 黄体週期の 5~14日 사이에는 어느 時期에나 多排卵誘起가 가능하지만, 표 2에 의하여 알 수 있는 바와 같이 發精週期の 第8日부터 第12日 사이가 處理에 대한 卵巢의 反應이 가장 良好한 것으로 알려져 있다. 또 未經産牛의 경우는 PMSG나 FSH와 같은 性腺刺戟호르몬의 单独投與보다는 이들 호르몬중의 어느 하나와 LH를 併用하는 편의 排卵成績이 良好한 것으로 알려져 있다 (표 3 참조).

同一個체에 대하여 多排卵處理를 반복할 경우 處理間의 期間이 짧으면 호르몬에 대한 卵巢反應이 弱化되어 發育하는 卵胞數가 急減한다. 그러나 處理間隔을 90~100日 以上으로 擴大하면 反復處理에서 오는 卵巢反應의 弱化는 현저

하게 방지된다 (표 4 참조).

3. 授 精

多排卵處理를 실시한 다음 發精이 오면 소위 Standing estrus의 時期를 잡아 自然交配나 人工授精을 실시한다. 단 多排卵을 誘起시켰을 경우 最初의 排卵과 最後의 排卵 사이에는 24時間 前後의 時間的 隔差가 있으므로 未受精卵의 發生을 防止하기 위하여 대략 8~12時間 間隔으로 연속 3회의 授精을 실시한다.

그러나 發精狀態가 長期間 持續될 때는 4회 까지라도 精液을 注入하는 것이 안전하다. 이렇게 해도 20%前後의 卵子는 未受精狀態로 回收되는 것이 보통이다.

性成熟에 도달하지 않은 幼若牝牛도 生後 1.5~2個月 以後부터는 投與하는 性腺刺戟호르몬에 反應하여 多數의 排卵이 일어난다. 그러나 精液을 子宮腔內에까지 注入하지 않는 한 卵子의 受精은 전혀 이루어지지 않는다. 精液을 子宮腔內에 注入해도 受精率은 20%를 넘지 못한다는 報告가 있다.

한편 卵巢에서 体外로 回收된 卵子를 体外(in

Table 3. Analysis of superovulation, recovery and fertilization rates in gonadotropin-treated prepubertal calves

Treatment ^a group	Ovulations X±S.D.	Recovered X±S.D.	Fertilized X±T.D.	Unfertilized X±S.D.
PMSG	2.0±2.9	1.1±2.2	0.3±0.5	0.9±1.9
PMSG+LKH	11.3±23.0	8.0±16.0	5.6±11.0	2.4±5.1
FSH	2.0±2.5	1.4±2.7	0.3±0.8	1.1±2.6
FSH + LH	21.9±28.0	10.9±13.1	3.6±4.1	7.3±3.7

^a: Seven animals per treatment group (Mickelsen et al., 1978)

Table 4 Effect of repeat superovulation on the number of mature follicle and the rate of ovulation

Superovulation of	Average days from previous treatment	No of cow	Total No of mature follicle	No of mature follicle per cow	Total No of corpus luteum estimated	Rate of ovulation
1st treatment		15	310	20.7±8.60	295	95.16
2nd treatment	98.8	15	301	20.1±8.42	286	95.02
3rd treatment	137.3	12	175	14.6±4.24	165	94.28
4th treatment	84.7	10	154	15.4±7.45	141	91.55
5th treatment	109.5	8	109	13.6±3.64	97	88.99

(Chung and Carmichael, Unpublished)

Vitro)에서 受精시키려는 試圖도 實驗的으로는 성공을 거두었으나, 牛精자의 受精能力을 体外에서 獲得시킬 수 있는 簡便한 방법이 確立되지 않아, 今後의 研究에 期待할 수 밖에 없는 실정이다.

4. 採 卵

排卵된 卵자를 回收하는 방법에는 外科的 方法과 非外科的 方法이 있다.

(1) 外科的 方法

供試牛를 屠殺하여 卵자를 채취하면 난자의 回收率は 높으나 供卵牛의 再利用이 不可能하므로 特殊한 경우를 제외하고는 이 방법을 피하고 있다. 그러나 供卵牛를 屠殺하지 않고 開腹手術을 실시하여 卵管이나 子宮을 灌流시키는 방법은 현재도 各種家畜에서 널리 이용되고 있

다.

흔히 실시하는 開腹手術의 術式은 供卵牛를 仰臥位로 保定하여 전신마취를 시킨 다음 下部의 乳房前方 正中線을 따라 10~15cm를 切開, 生殖器를 引出한 다음 卵管이나 子宮를 灌流한다. 卵管灌流法에는 上向式과 下向式이 있으며 어느 方法에 의하든, 子宮灌流보다는 卵자의 回收率이 높으나 排卵後 4~5日後에는 卵자가 子宮內로 하강하므로, 이 기간 이후에 採卵코자 할 때에는 子宮灌流法을 채택해야 한다.

子宮灌流法에도 上向式과 下向式이 있으나, 어느 方法에 의하든 子宮內膜에 대한 損傷이 심한 데다가 卵자回收率도 卵管灌流法에 미치지 못한다.

外科的 方法에 의하여 卵자를 回收했을 경우의 回收率은 표 5에 표시된 바와 같이 36.9%로

Table 5 Recent recoveries of embryos from superovulated cattle at surgery or slaughter

No. donors flushed	Collection		Ovulations		Embryos and unfer. utilized ova recovered			Embryos recovered				References
	Day	Method	Total	Av/ flushed donor	Total	% ovulations	Av/ flushed donor	Total	% total recovered	% ovulations	Av/ flushed donor	
44	2 - 11	Surgery and slaughter	454	10.3	210	46.3	4.8	154	73.3	33.9	3.5	Betteridge and Mitchell, 1974
10	3 - 6	Surgery	141	14.1	97	68.9	9.7	85	87.6	60.3	8.5	Elsden et al. 1974
25	3 - 6	Surgery	462	18.5	184	39.8	7.4	166	90.2	35.9	6.6	Booth et al 1975
90	2 - 9	Slaughter	549	61	364	66.3	4.0	243	66.8	44.3	2.7	Testart, 1975
98 (cows)	2 - 5	Slaughter	347	3.5	254	73.2	2.6	201	79.1	57.9	2.1	Moore, 1975
23 (Heifers)	2 - 5	Slaughter	157	6.8	122	77.7	5.3	116	95.1	73.9	5.0	Moore, 1975
147	-		2308	15.7	1411	61.1	9.6	1235	87.5	53.5	8.4	Gordon, 1976
21	2 - 7	Slaughter	182	8.7	91	50.0	4.3	38	41.8	20.9	2.3	ADRI, 1977
34	10 - 16	Surgery	331	9.7	122	36.9	3.6	88	69.7	25.7	2.5	" "
34	10 - 16	Slaughter	384	11.3	226	58.9	6.6	124	54.9	32.3	3.6	" "
582	Usually	Surgery	-	10.15	-	59.67	-	-	58.78	-	-	Shea et al. 1976
27	7 - 12	Slaughter	264	9.8	165	62.5	6.1	114	69.1	43.2	4.2	Brand et al 1977

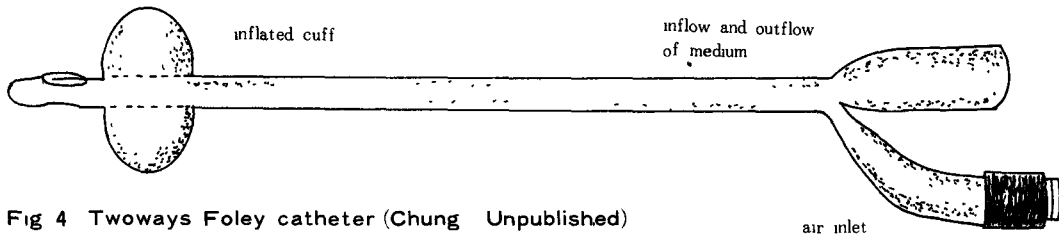


Fig 4 Twoways Foley catheter (Chung Unpublished)

부터 77.7%에 이르기까지 報告者에 따라 차이가 있으나 최근 기술적인 改善이 이루어져 60~70%의 回收은 무난한 것으로 보고되고 있다.

(2) 非外科的 方法

소와 말과 같은 대동물에서 개복수술을 실시하기 위해서는 특수한 설비와 노력을 요구할뿐 아니라, 수술후 生殖器가 癒着하여 同一個體에 대한 反復處理가 곤란하다는 難點이 있다. 이러한 難點을 克服하기 위하여 최근에는 수술을 하지 않고 子宮內에 下降한 受精卵을 回收하는 방법이 개발되었다. 즉, 採卵을 위하여 고찰된 採卵器를 使用하여 子宮을 洗滌하는 방법으로, 採卵器에는 two way式, three way式 등 여러가지가 있다 최근에는 인간의 膀胱洗滌器와 같은 구조를 가진 Foley Catheter를 사용하여 좋은 성적을 올리게 되었다(그림 4 참조). 이 방법의 概要를 설명하면 다음과 같다.

가축을 保定한다. 4~7ml의 2% procaine 을 脊髓에 注射함으로써 直腸의 蠕動을 抑制한 다음 宿便을 제거한다. 子宮頸 擴張棒을 使用하여 子宮頸管을 擴張, Foley Catheter를 子宮腔內에 삽입한다. 이때 삽입을 용이하게 하기 위하여 Catheter內에 가는 鐵棒을 삽입하여 Catheter를 지지한다. Catheter의 先端이 한쪽 子宮角의 基部에서 4~5cm들어간 위치에 도달하면 空氣注入口를 통하여 20~30cc의 공기를 Cuff에 넣어 팽창시킴으로서 Catheter를 고정시킨다. 鐵棒을 빼내고 그림 5에서 보는 바와 같이 洗滌液과 採取管으로 同時에 연결된 Vinyl管을 Catheter와 연결시킨다. 授取管으로 연결된 管을 차단한 다음 洗滌液과 연결된 管을 열면 洗

滌液이 子宮角內에 注入된다. 子宮角에 가벼운 맛사지를 가한 다음, 洗滌液과 연결된 管을 차단하고 채취관과 연결된 管을 開口하면 卵子를 含有한 子宮角內의 洗滌液이 流出되어 채취관에 고인다. 이 液을 一定時間(30分以上) 放置한 다음 管의 低面에 있는 液으로부터 一定量 petridish에 취하여 Stereo microscope下에서 40~60배로 확대하여 卵子를 찾아 保存液으로 옮겨 移植時까지 保存한다.

이 方法에 의하여 卵子를 回收할 때에는 排卵後 5日이상 경과한 다음이 아니면 안된다. 그

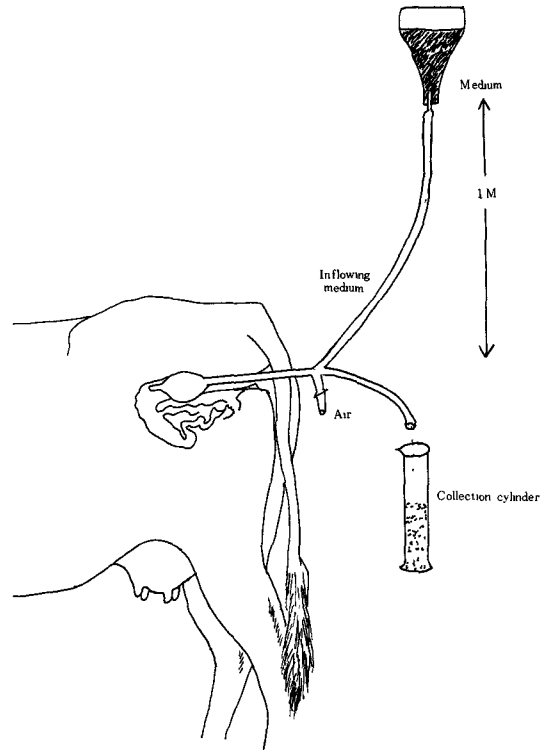


Fig 5 Non-surgical embryo recovery (Elsden et al., 1976)

Table 6 Recovery rates for ova and fluid from superovulated heifers

Item	Nonsurgical recovery (15) ^a			Surgical recovery (29)		
	Mean	S. D.	Range	Mean	S. D.	Range
No ova recovered/heifer	6.3	± 4.4	1-14	6.2	±5.5	0-21
No corpora lutea/heifer ^b	12.2	± 4.9	1-22	9.9	±6.3	1-29
Index of recovery of ova/ heifer (%) ^c	54	± 29	13-100	58	±29	0-100
Fluid inserted/heifer (ml)	933	±280	543-1390	-	-	-
Fluid recovered/heifer (%)	92	± 6	78-99	-	-	-
% of recovered ova/heifer which were in .						
1st flush	31	± 31	0-100	-	-	-
2nd flush	27	± 20	0-60	-	-	-
3rd flush	17	± 23	0-75	-	-	-
4th flush	4	± 8	0-22	-	-	-
5th flush	21	± 22	0-67	-	-	-

(Rowe et al, 1976)

^a No. of heifers in parenthesis.

^b No. of corpora lutea estimated by laparoscopy in 11 heifers and by rectal palpation in 4 heifers for nonsurgical recovery and by visual inspection for surgical recovery.

^c No. ova recovered ÷ estimated no. corpora lutea x 100.

것은 그림 6에 의하여 알 수 있는 바와 같이 排卵된 卵子の 대부분이 卵管을 통과하여 子宮內에 진입하는 데에는 5일이상 걸리기 때문이다. 대체로 排卵後 5~6日째에 이 방법으로 卵子를 採取하면 好結果를 기대할 수 있다. 이 방법에 의하여 卵子를 채취하였을 때의 成

績은 표 6에 의하여 알 수 있는 바와 같이 外科的方法에 의했을 때보다 다소 떨어지는 경향이 있으나, 그 차이는 근소할 뿐 아니라, 종합적으로 考察할 때 후자보다 簡便하고 効率的인 방법이라 하겠다.

5. 採取된 卵子の 檢査

採卵된 卵子를 모두 移植에 活用할 수 있는 것은 아니다. 未受精卵을 除去해야 함은 勿論이요, 形態의 異狀이 있는 受精卵도 移植에 活用하지 않는 것이 좋다. 受精卵의 形態的 異狀은 移植後의 妊娠率을 저하시키는 결정적 요

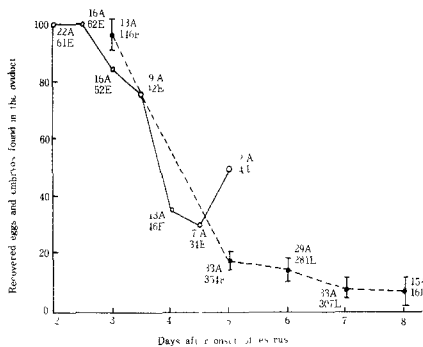


Fig 6 The location of eggs and embryos flushed from cattle 2-8 days after estrus

Data from Moore, 1975a (0—0); and Newcomb, Rowson and Trounson, 1976 (0-----0). Numbers of animals (A) and eggs/embryos (E) from which each point is derived are indicated. Vertical bars indicate SE of mean.

Table 7 The effect of embryo quality on pregnancy rate

Embryo Quality	Number of embryos transferred	Number of Pregnancies	Percent
Good	1809	1272	70 ^a
Fair, Poor	694	380	55 ^b
Totals	2503	1652	66

^{a, b} Pregnancy rates with different superscripts are significantly different (p < .05) (Schneider et al, 1980)

인이 되기 때문이다(표 7 참조). 각종 형태적 이상을 圖示하면 그림 7 과 같다.

한편 受精卵의 發達段階도 移植後의 妊娠率에 影響을 미친다. 일반적으로 2~16細胞期나 桑實期보다는 胚盤胞期까지 發達한 受精卵를 移植하였을 때의 妊娠率이 높은 것으로 알려져 있다(표 8 삽입).

이상과 같은 점을 勸察할 때 기능적으로나 형태적으로 정상적인 受精卵를 선별하여 移植하는 것은 受精卵移植技術의 성공을 위해서 매우 중요한 작업의 하나임에 틀림없다. 그러나 이러한 작업을 완벽하게 실시할 수 있는 방법은 아직 확립되어 있지 않다. 移植用 卵子를 損傷하지 않고 그 受精卵의 生死如否를 단시간에 판명할 수 있는 간단한 방법은 없기 때문에 난자의 생존에 惡影響을 미치지 않도록 주의하면서 顯微鏡下에서 형태적으로 정상적인 수정란을 선별하여 移植하는 것이 현재의 실정이다. 그러나 형태적으로 정상적인 卵子라고 하여 모두 正常的인 受精卵이라고 볼 수는 없다. 凍結處理를 받은 受精卵는 형태적으로는 하등의 異狀이 없음에도 불구하고 이미 死滅했거나 發達能力을

喪失한 것도 많기 때문이다.

6. 受精卵의 体外保存

受精卵를 이식할 때에는 이식하는 수정란의 일령과 수정란을 받아 들이는 모체의 배란후의 經過日數가 일치하지 않으면 안된다. 그러나 수정란을 채취당시의 상태로 체외에서 장기적으로 보존할 수 있다면 受卵牛의 배란후의 경과일수가 수정란의 日齡과 같아질 때까지 待期하였다

Table 8 The effect of embryo stage on pregnancy rate

Stage	Number of embryos transferred	Number of Pregnancies	Percent
Early Morula	686	359	61 ^a
Late Morula	1178	792	67 ^b
Early Blastocyst	600	402	67 ^b
Late Blastocyst	139	99	71 ^b
Totals	2503	1652	66

^{a, b} pregnancy rates with different superscripts are significantly different ($p < .05$) (Schneidgr et al., 1980)

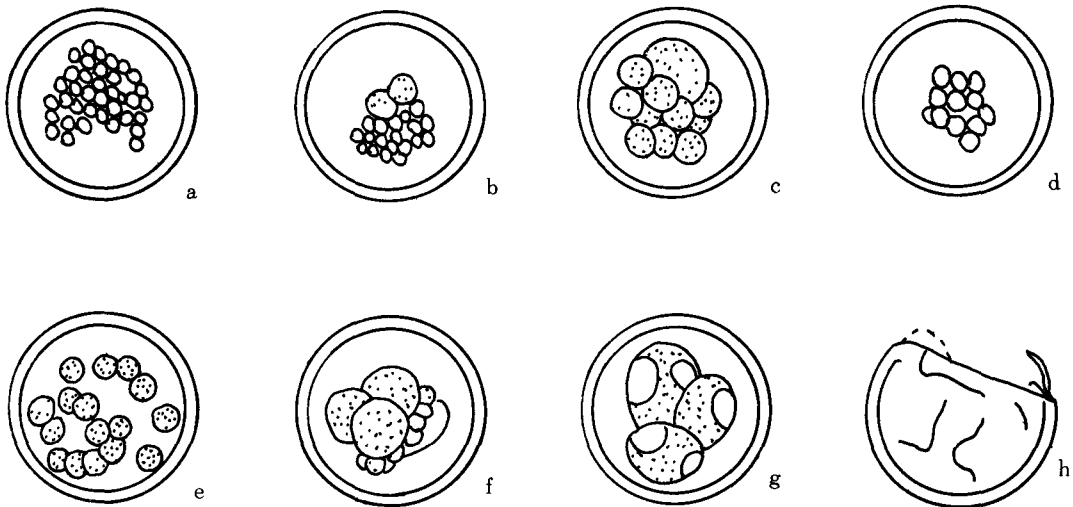


Fig 7 Morphologically abnormal embryos a, Tight morula with oval zona; b, morula with excluded blastomeres, c, irregular blastomeres, d, morula with debris; e, loose blastomeres, f, irregular cell mass, g, vacuoles in cytoplasm; h, cracked, empty zona pellucida. (Sugie et al, 1980)

가 移植할 수 있기 때문에 供卵牛와 受卵牛의 發精週期를 同期化시키기 위한 특별한 處理를 하지 않아도 되고 또 卵子의 國際的 輸送도 가능하여지기 때문에, 受精卵移植技術의 産業적 이용가치는 그만큼 높아질 것이다.

(1) 37°C에서 保存

채취된 수정란은 생리적 適溫인 37°C에서 보존하였을 때 보존시간의 경과에 수반되는 이식 후 受胎率의 변화는 표 9에서 보는 바와 같다. 적어도 보존 7時間까지는 受胎率의 有意한 低下가 인정되지 않는다. 그러나 아무리 주의를 해도 37°C에 있어서의 수정란 보존시간이 24시간을 경과하면 이식후의 수태율은 저하한다. 따라서 수정란을 37°C에서 보존할 수 있는 시간상의 上限은 소 24時間, 산양 7時間, 돼지 48時間, 면양 120時間으로 비교적 짧다. 그러나 소의 수정란은 結紮된 토끼 卵管內에 넣어 보존하

Table 9 Effect of duration of storage on the fecundation rate

Duration of storage	No. eggs transferred	No. pregnancy	Rate of fecundation
1	19	10	52.6
2	243	122	50.2
3	237	96	40.5
4	145	61	42.1
5	57	16	28.1
6	21	8	38.1
7	8	4	50.0
Total	730	317	43.4 (average)

(金川 1976)

면 72시간 보존한 다음에도 80%의 卵子는 受胎能力을 保存한다.

(2) 低温保存

난자의 代謝를 억제하여 그 生存을 연장시킬 목적으로 生理溫度인 37°C보다 낮은 온도에서 장기간 보존하려는 노력도 상당히 양호한 결과를 얻고 있다. 受精卵를 15~20°C에서 보존하면 24시간 이내에서는 移植後의 受胎能力에 큰 영향을 미치지 않는다. 그러나 보존 온도를 0°C로 낮추면, 移植後의 受胎率은 다소 떨어지나 수일간 보존이 가능해진다. 그러나 돼지의 受精卵은 15°C 이하에서는 생존이 불가능하다.

소의 胚盤胞를 0°C에서 2分부터 48시간까지 보존하였을 때, 이러한 冷却處理가 胚發達에 미치는 영향은 표10에서 보는 바와 같다.

(3) 凍結保存

受精卵을 마치 凍結精液처럼 -196°C의 超低温에 보존하여 受胎能力을 永続化시키려는 연구는 1970년대 초반부터 시도되었다. 그러나 低温衝擊에 의한 受精卵의 低抗性은 精子의 그것에 비하여 훨씬 微弱하기 때문에 현재까지도 技術上의 完全한 성공을 보지 못한 채 完만한 개선이 이루어지고 있는 실정이다. Whittingham (1971)이 생쥐卵子의 凍結保存에 성공한 이래 技術的 進展이 급속도로 이루어져 소의 수정란을 凍結保存하는데 성공했다는 사례도 계속 보고되었다 (표11참조).

Table 10 Development of cow blastocysts in culture for 24 hours after cooling to 0°C.

Age of embryo	Stage of development before cooling		Storage time at 0°C	Development in culture after cooling		
	Early	Expanded		No. degenerate	No. partly developed	No. normal (%)
Day 6	6	6	2mn	5	1	6 (50)
Day 7	12	2	30min	0	1	13 (92)
Day 7	8	10	24hr	3	3	12 (67)
Day 7	11	12	48hr	6	6	11 (48)

(Trounson et al., 1976)

*In the four groups, 12, 2, 10 and 13 embryos, respectively, had been cultured for 24 hours to the blastocysts stage before cooling.

Table 11 Results of bovine embryo transfer following freeze storage at -196

Stage of embryo	No. embryo transferred	No. of transfer	No. of pregnancy	No. of calving	References
Blastocyst	21	11	1	1	Wilmot & Rowson (1973)
Morula & blastocyst	23	17	6	-	Bilton & Moore (1977)
Morula blastocyst	8	5	1	1	Moore & Bilton (1977)
	8	6	4	4	
Blastocyst	23	11	8	10	Willadsen (1977)
Blastocyst	46	35	13	-	Willadsen et al. (1977)

Table 12 Cattle blastocysts frozen in 1.5M DMSO/PBS Cooling/freezing: 1°C/min to -7°C, seeding 0.3°C/min to -36°C, 0.1°C to -60°C, LN2 -196°C, Thawing: 4°C/min from -50°C to -10°C Direct water at 20°C Addition and dilution of DMSO: Room temperature

	Frozen	Thawed	Survived*	%	Transferred**	Pregnant	%
Ampoule	41	41	30	73	19	9	42

* Evaluation after 4-8h culture in PBS+20% FCS at 37°C

**Surgical transfers. Flank incision (Lehn-Jeusen 1980)

Table 13 Cattle blastocysts frozen in 0.5M DMSO/1.0M glycerol/PBS. Cooling/freezing: 1°C/min to -7°C, seeding 0.3°C/min to -30°C, 0.1°C to -40°C, LN2 -196°C Thawing: 8°C/min from -35°C to -10°C Direct water at 37°C Addition and dilution of DMSO/glycerol: Room temperature.

	Frozen	Thawed	Survived*	%
Ampoule	21	20	9	43
Straw	8	8	3	38
Total	29	28	12	41

* Evaluation after 12-24h culture in PBS+20% FCS at 37°C (Lehn-Jensen, 1980)

受精卵의凍結保存을 위하여 Computer를 장치한凍結器가 개발되었으며 Jensen等(1980)은 자신들이 제작한凍結器를 사용하여 소의 수정란을 -196°C에서凍結保存한 다음, 이것을 이식하여 75%라는 양호한 성적을 얻고 있다(표 12, 13, 14참조). 그러나 표 14에 의하여 알 수 있는 바와 같이 이 75%라는 성적은 供試動物 4頭에서 얻은 성적이기 때문에 신뢰성이 낮고 아직 追試한 성적도 보고되고 있지 않아, 그들의 성공을 재확인하기 까지에는 다소 시간이 필요할 것 같다.

(계속)

Table 14. Cattle blastocysts frozen in 1.5M DMSO/PBS. Cooling/freezing: 1°C/min to -7°C seeding 0.3°C/min to -30°C, 0.1°C/min to -40°C, LN2 -196°C Thawing A: 8°C/min from -35°C to -10°C Direct water at 37°C, or B: Direct water at 37°C Addition and dilution of DMSO: Room temperature

	Frozen	Thawed		Survived*		%		Transferred**	Pregnant	%
		A	B	A	BB	A	B			
Ampoule	31	20	11	13	3	65	26	4	3	75
Straw	14	3	11	2	2	66	18	-	-	-
Total	45	23	22	15	5	65	23			

* Evaluation after 4-8h culture in PBS+20% FCS at 37°C

**Surgical transfers. Flank incision. (Lehn-Jensen, 1980)